



등록특허 10-2947418



(19) 대한민국 지식재산청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년04월07일

(11) 등록번호 10-2947418

(24) 등록일자 2026년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2024.08) A61K 36/70 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2024.08)

A61K 36/70 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0124455

(22) 출원일자 2024년09월12일

심사청구일자 2024년09월12일

(65) 공개번호 10-2026-0038984

(43) 공개일자 2026년03월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020250063620 A

KR1020250173768 A

(73) 특허권자

재단법인 경기도경제과학진흥원

경기도 수원시 영통구 광교로 107 (이의동)

(72) 발명자

안은경

경기도 수원시 영통구 웰빙타운로 130, 8901동
303호(이의동, 광교파크자이더테라스)

이재연

경기도 화성시 동탄반석로 70 솔빛마을신도브레뉴
아파트 433동 2001호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 태웅

전체 청구항 수 : 총 5 항

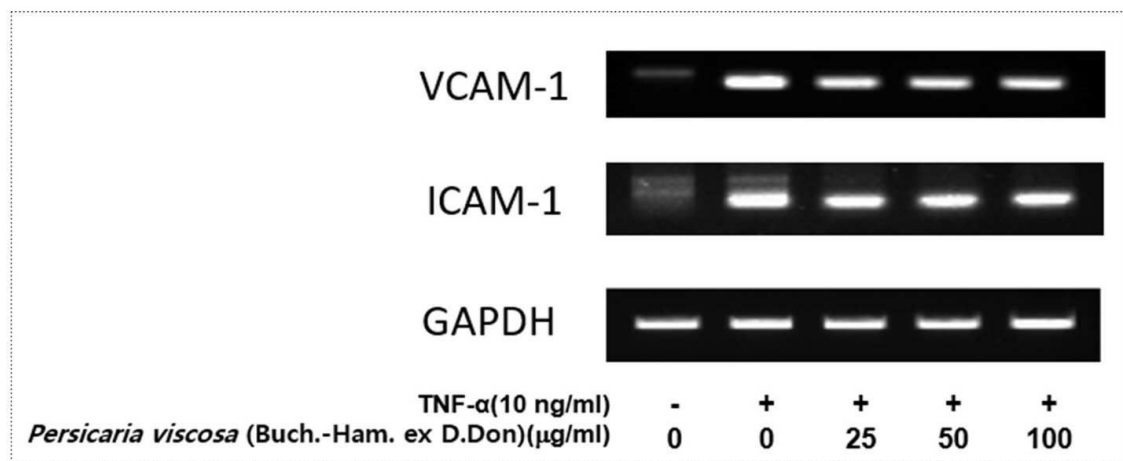
심사관 : 박소영

(54) 발명의 명칭 기생여뀌 추출물을 이용한 혈행 개선용 조성물

(57) 요약

TNF- α 에 의해 자극된 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 전사(transcription) 및 번역(translation) 수준에서 억제하는 활성을 지닌, 기생여뀌 추출물을 이용한 혈행 개선용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 9/00 (2018.01)

A61P 9/10 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2200/3262 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

정원식

경기도 화성시 향남읍 상신하길로274번길 21, 705
동 804호(서봉마을 사랑으로 부영7단지아파트)

정연우

경기도 화성시 효행구 효행로291번길 26, 102동
803호 (기안동, 신일해피트리)

명세서

청구범위

청구항 1

기생여뀌 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 기생여뀌 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 혈행 개선은 혈관 내피 기능 장애 개선에 의한 혈행 개선인 조성물.

청구항 4

기생여뀌 추출물을 유효성분으로 포함하는 죽상동맥경화증 또는 혈관 내피 기능 장애 치료 또는 예방용 억제학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 기생여뀌 추출물은 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매 추출물인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 기생여뀌(*Persicaria viscosa*) 추출물을 이용한 혈행 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] ICAM-1(intracellular adhesion molecule 1)과 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule 1)을 포함한 세포 부착 분자(CAM, Cell adhesion molecules)는 급성 또는 만성 염증 상태에서 혈관 내피세포에 대한 백혈구 부착을 조절하는 면역글로불린 계열의 인자들이다(Gastroenterology. 1999;1 doi: 10.1016/S0016-5085(99)70070-3). 염증성 사이토카인인 TNF- α 는 염증 분자나 다양한 사이토카인의 생성을 유도하여 세포증식, 세포자멸(apoptosis), 염증, 활성산소종 생성 등에 관여하고, 또 혈관 내피세포에서는 ICAM-1, VCAM-1 등의 세포 부착 분자의 생성을 유도한다(Int. J. Mol. Sci. 2018 doi: 10.3390/ijms19041057). ICAM-1, VCAM-1는 염증 부위로 호산구, 호염기구, 단핵구, 림프구와 같은 백혈구의 이동과 부착을 조절한다(J. Mol. Med. 1996;74; Int. J. Mol. Sci. 2018 doi: 10.3390/ijms19041057).

[0004] 죽상동맥경화증(atherosclerosis)은 관상동맥질환, 심부전, 뇌졸중, 허혈성 괴저, 복부 대동맥류 등과 같은 심혈관 질환의 근본 원인이며, 혈관 내피세포에서 발생하는 염증이 이러한 죽상동맥경화증의 발병의 주된 원인으

로 알려져 있다(Clinics. 2018;28 doi: 10.6061/clinics/2018/e203). ICAM-1, VCAM-1는 혈관 내피세포에서 발생하는 염증 반응의 주요 인자로서 ICAM-1, VCAM-1의 과발현은 내피 기능 장애(vascular endothelial dysfunction)를 유발하며, 이러한 내피 기능 장애는 죽상동맥경화증의 초기 지표로 간주된다(Thromb. Vasc. Biol. 2007;27). 즉 혈관 내피세포에서 염증 반응으로 발생하면 ICAM-1, VCAM-1과 같은 부착 분자가 과도하게 분비되어 백혈구가 혈관 내피세포에 부착되게 하고 또 내피의 손상된 부위에서 산화된 콜레스테롤이 쌓여 플라크가 형성되면서 혈관 내벽이 부풀어 오르고 혈관이 좁아져 혈액의 흐름이 방해받게 된다(Thromb. Vasc. Biol. 2007;27; Biology. 2020;29 doi: 10.3390/biology9110368; Circulation . 2004 Jun 15;109(23 Suppl 1):III27-32).

[0005] 현재 ICAM-1, VCAM-1는 죽상동맥경화증 진단의 매우 유용한 비침습적 바이오마커들이며(J. Clin. Investig. 2001;15 doi: 10.1172/JCI11871; Biology. 2020;29 doi: 10.3390/biology9110368), 또 내피 기능 장애, 죽상동맥경화증의 중요한 치료적 표적으로 주목받고 있다(Cardiovasc Res. 2023 Sep; 119(13):2278-2293; Laboratory Investigation 100:378-386, 2020)

[0006] 본 발명은 기생여귀 추출물이 혈관 내피세포에서 TNF- α 에 의한 ICAM-1, VCAM-1의 상향 발현을 억제함에 기초하여 기생여귀 추출물의 혈행 개선 효과를 개시한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 기생여귀 추출물을 이용한 혈행 개선용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적이나 구체적인 목적은 이하에서 제시될 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 아래의 실시예에서와 같이, 기생여귀 추출물이 TNF- α 에 의해 자극된 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 전사(transcription) 및 번역(translation) 수준에서 억제함을 확인함으로써 완성된 것이다.

[0012] 본 발명은 이러한 실험 결과에 기초하여 제공되는 것으로, 일 측면에서 본 발명은 기생여귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈행 개선용 조성물로 파악할 수 있고, 다른 측면에 있어서는 기생여귀 추출물을 유효성분으로 포함하는 내피 기능 장애 또는 죽상동맥경화증 치료 또는 예방용 조성물로 파악할 수 있다.

[0013] 본 명세서에서, "추출물"이란 추출 대상 식물의 줄기, 잎, 종자, 꽃, 뿌리 등을 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜(메탄올, 에탄올, 부탄올 등), 메틸렌클로라이드, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, N,N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 침출하여 얻어진 추출물, 이산화탄소, 펜탄 등 초임계 추출 용매를 사용하여 얻어진 추출물 또는 그 추출물을 분획하여 얻어진 분획물을 의미하며, 추출 방법은 활성물질의 극성, 추출 정도, 보존 정도를 고려하여 냉침, 환류, 가온, 초음파 방사, 초임계 추출 등 임의의 방법을 적용할 수 있다. 분획된 추출물의 경우 추출물을 특정 용매에 현탁시킨 후 극성이 다른 용매와 혼합·정지시켜 얻은 분획물, 상기 조추출물을 실리카겔 등이 충전된 칼럼에 흡착시킨 후 소수성 용매, 친수성 용매 또는 이들의 혼합 용매를 이동상으로 하여 얻은 분획물을 포함하는 의미이다. 또한 상기 추출물의 의미에는 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조 등의 방식으로 추출 용매가 제거된 농축된 액상의 추출물 또는 고형상의 추출물이 포함된다. 바람직하게는 추출용매로서 물, 에탄올 또는 이들의 혼합 용매(에탄올 함량 40~60%)를 사용하여 얻어진 추출물을 의미한다.

[0014] 또 본 명세서에서, "혈행 개선"은 혈관 내피 기능 장애 개선, 내피세포의 활성화 및/또는 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현 억제에 따른 백혈구의 부착 억제에 의한 혈행 개선을 의미한다.

[0015] 또 본 명세서에서 "유효성분"이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미한다.

[0016] 본 발명의 조성물은 그 유효성분을 혈행 개선 활성 등을 나타낼 수 있는 한, 용도, 제형, 배합 목적 등에 따라 임의의 양(유효량)으로 포함될 수 있는데, 통상적인 유효량은 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.001 중량 % 내지 20.0 중량 % 범위 내에서 결정될 것이다. 여기서 "유효량"이란 그 적용 대상인 포유동물 바람직하게는 사

람에게 의료 전문가 등의 제언에 의한 투여 기간 동안 본 발명의 조성물이 투여될 때, 혈행 개선 등 의도한 기능적·약리학적 효과를 나타낼 수 있는, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분의 양을 말한다. 이러한 유효량은 당업자의 통상의 능력 범위 내에서 실험적으로 결정될 수 있다.

[0017] 본 발명의 조성물은 유효성분 이외에, 혈행 개선 효과의 상승·보강을 위하여 또는 고지혈증 개선 등 유사활성의 부가를 통한 복용이나 섭취의 편리성을 증진시키기 위하여, 당업계에서 이미 안전성이 검증되고 해당 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 화합물 또는 추출물에는 각국 약전(한국에서는 「대한민국약전」), 각국 건강기능식품공전(한국에서는 식약처 고시인 「건강기능식품 기준 및 규격」임) 등의 공정서에 실려 있는 화합물 또는 추출물, 의약품의 제조·판매를 규율하는 각국의 법률(한국에서는 「약사법」임)에 따라 품목 허가를 받은 화합물 또는 추출물, 건강기능식품의 제조·판매를 규율하는 각국 법률(한국에서는 「건강기능식품에관한법률」임)에 따라 기능성이 개별적으로 인정된 화합물 또는 추출물이 포함된다.

[0018] 예컨대 한국 건강기능식품법에 따라 「건강기능식품 기준 및 규격」에 등재되거나 개별적으로 "혈행 개선" 기능성을 인정받은, EPA 및 DHA 함유 유지, 감마리놀렌산 함유 유지, 영지버섯 자실체 추출물, 은행잎 추출물, 홍삼, 포도잎 추출물, 상황버섯등 추출 복합물, L-아르기닌, 카카오 분말, 나토균 배양 분말, 정제 오징어유, PME-88 메론 추출물이나, 또 예컨대 한국 건강기능식품법에 따라 「건강기능식품 기준 및 규격」에 등재되거나 개별적으로 "중성지방 혈중 개선"으로 인정받은 EPA 및 DHA 함유 유지, 난소화성 말토덱스트린, 글로빈 가수분해물, 식물성 유지 디글리세라이드, 정제 오징어유, 또 예컨대 한국 건강기능식품법에 따라 「건강기능식품 기준 및 규격」에 등재되거나 개별적으로 "콜레스테롤 혈중 개선"으로 인정받은 구아검이나 구아검 가수분해물, 귀리 식이섬유, 글루코만난(곤약, 곤약 만난), 녹차 추출물, 대두 단백질, 보이차 추출물, 식물 스타놀 에스테르, 보리 베타글루칸 추출물 등을 들 수 있다.

[0019] 본 발명의 조성물은 구체적인 양태에 있어서, 식품 조성물로 파악될 수 있다.

[0020] 본 발명의 식품 조성물은 어떠한 형태로도 제조될 수 있으며, 예컨대 차, 주스, 탄산음료, 이온음료 등의 음료류, 우유, 요구르트 등의 가공 유류, 껌류, 떡, 한과, 빵, 과자, 면 등의 식품류, 정제, 캡슐, 환, 과립, 액상, 분말, 편상, 페이스트상, 시럽, 겔, 젤리, 바 등의 건강기능식품 제제류 등으로 제조될 수 있다.

[0021] 또 본 발명의 식품 조성물은 법률상·기능상의 구분에 있어서 제조·유통 시점의 시행 법규에 부합하는 한 임의의 제품 구분을 댈 수 있다. 예컨대 한국 「건강기능식품에관한법률」에 따른 건강기능식품이거나, 한국 「식품위생법」의 식품공전(식약처 고시 「식품의 기준 및 규격」)상 각 식품유형에 따른 과자류, 두류, 다류, 음료류, 특수용도식품 등일 수 있다.

[0022] 본 발명의 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 식품첨가물이 포함될 수 있다. 식품첨가물은 일반적으로 식품을 제조, 가공 또는 보존함에 있어 식품에 첨가되어 혼합되거나 침윤되는 물질로서 이해될 수 있는데, 식품과 함께 매일 그리고 장기간 섭취되므로 그 안전성이 보장되어야 한다. 식품의 제조·유통을 규율하는 각국 법률(한국에서는 「식품위생법」임)에 따른 식품첨가물공전에는 안전성이 보장된 식품첨가물이 성분 면에서 또는 기능 면에서 한정적으로 규정되어 있다. 한국 식품첨가물공전(식약처 고시 「식품첨가물 기준 및 규격」)에서는 식품첨가물이 성분 면에서 화학적 합성품, 천연 첨가물 및 혼합 제제류로 구분되어 규정되어 있는데, 이러한 식품첨가물은 기능 면에 있어서는 감미제, 풍미제, 보존제, 유효제, 산미료, 점증제 등으로 구분된다.

[0023] 감미제는 식품에 적당한 단맛을 부여하기 위하여 사용되는 것으로, 천연의 것이거나 합성된 것 모두 본 발명의 식품 조성물에 사용할 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.

[0024] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 하기 위한 용도로 사용되는 것으로, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 자스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제로서는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.

[0025] 보존제로서는 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등이 사용될 수 있고, 또 유효제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검,

펙틴 등이 사용될 수 있으며, 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등이 사용될 수 있다. 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다. 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등이 사용될 수 있다.

- [0026] 본 발명의 식품 조성물은 전술한 바의 식품첨가물 이외에, 기능성과 영양성을 보충·보강할 목적으로 당업계에 공지되고 식품첨가물로서 안정성이 보장된 생리활성 물질이나 미네랄류를 포함할 수 있다.
- [0027] 그러한 생리활성 물질로서는 녹차 등에 포함된 카테킨류, 비타민 B1, 비타민 C, 비타민 E, 비타민 B12 등의 비타민류, 토코페롤, 디벤조일티아민 등을 들 수 있으며, 미네랄류로서는 구연산칼슘 등의 칼슘 제제, 스테아린산 마그네슘 등의 마그네슘 제제, 구연산철 등의 철 제제, 염화크롬, 요오드칼륨, 셀레늄, 게르마늄, 바나듐, 아연 등을 들 수 있다.
- [0028] 본 발명의 식품 조성물에는 전술한 바의 식품첨가물이 제품 유형에 따라 그 첨가 목적을 달성할 수 있는 적량으로 포함될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 기타의 식품첨가물과 관련하여서는 각국 식품공전이나 식품첨가물 공전을 참조할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 다른 구체적인 양태에 있어서는 약제학적 조성물로 파악될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 약제학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하여 당업계에 공지된 통상의 방법으로 투여 경로에 따라 경구용 제형 또는 비경구용 제형으로 제조될 수 있다. 여기서 투여 경로는 국소 경로, 경구 경로, 정맥 내 경로, 근육 내 경로, 및 점막 조직을 통한 직접 흡수를 포함하는 임의의 적절한 경로일 수 있으며, 두 가지 이상의 경로를 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0032] 약학적으로 허용되는 담체는 투여 경로나 제형에 따라 당업계에 주지되어 있으며, 구체적으로는 "대한민국약전"을 포함한 각국의 약전을 참조할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물이 경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 현탁액, 웨이퍼 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이때 적합한 담체의 예로서는 락토스, 글루코스, 슈크로스, 텍스트로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨 등의 당류, 옥수수 전분, 감자 전분, 밀 전분 등의 전분류, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스, 하이드록시프로필메틸셀룰로오스 등의 셀룰로오스류, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트, 광물유, 맥아, 젤라틴, 탈크, 폴리올, 식물성유, 에탄올, 그리세롤 등을 들 수 있다. 제제화할 경우 필요에 따라적절한 결합제, 윤활제, 붕해제, 착색제, 희석제 등을 포함시킬 수 있다. 적절한 결합제로서는 전분, 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분페리스트, 젤라틴, 메틸셀룰로스, 소듐 카복시메틸셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 글루코스, 옥수수 감미제, 소듐 알지네이트, 폴리에틸렌 글리콜, 왁스 등을 들 수 있고, 윤활제로서는 올레산나트륨, 스테아르산나트륨, 스테아르산마그네슘, 벤조산나트륨, 초산나트륨, 염화나트륨, 실리카, 탈콰, 스테아르산, 그것의 마그네슘염과 칼슘염, 폴리데틸렌글리콜 등을 들 수 있으며, 붕해제로서는 전분, 메틸 셀룰로스, 아가(agar), 벤토나이트, 잔탄 검, 전분, 알긴산 또는 그것의 소듐 염 등을 들 수 있다. 또 희석제로서는 락토즈, 텍스트로즈, 슈크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스, 글라이신 등을 들 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약제학적 조성물이 비경구용 제형으로 제조될 경우, 적합한 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 주사제, 경피 투여제, 비강 흡입제 및 좌제의 형태로 제제화될 수 있다. 주사제로 제제화할 경우 적합한 담체로서는 수성 등장 용액 또는 현탁액을 사용할 수 있으며, 구체적으로는 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline)나 주사용 멸균수, 5% 텍스트로스 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 경피 투여제로 제제화할 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니먼트제, 에어로졸제 등의 형태로 제제화할 수 있다. 비강 흡입제의 경우 디클로로폴루오로메탄, 트리클로로폴루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 등의 적합한 추진제를 사용하여 에어로졸 스프레이 형태로 제제화할 수 있으며, 좌제로 제제화할 경우 그 담체로는 위텟솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 폴리에틸렌글리콜류, 카카오지, 라우린지, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르류, 폴리옥시에틸렌 스테아레이트류, 소르비탄 지방산 에스테르류 등을 사용할 수 있다.
- [0035] 약제학적 조성물의 구체적인 제제화와 관련하여서는 당업계에 공지되어 있으며, 예컨대 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)] 등을 참조할 수 있다. 상기 문헌은 본 명세서의 일부로서 간주된

다.

[0036] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 성별, 연령, 환자의 중증도, 투여 경로에 따라 1일 0.001mg/kg ~ 10g/kg 범위, 바람직하게는 0.001mg/kg ~ 1g/kg 범위일 수 있다. 투여는 1일 1회 또는 수회로 나누어 이루어질 수 있다. 이러한 투여량은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 아니 된다.

발명의 효과

[0038] 전술한 바와 같이, 본 발명에 따르면 기생여귀 추출물을 이용한 혈행 개선용 조성물을 제공할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물은 식품 또는 약품, 등으로 제품화될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1 유전자의 mRNA 발현 억제 정도를 보여주는 결과이다.

도 2는 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1 단백질 발현 억제 정도를 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예를 참조하여 설명한다. 그러나 본 발명의 범위가 이러한 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] <실시예> 기생여귀 추출물의 혈행 개선 효과

[0045] 1. 기생여귀 추출물의 제조

[0046] 건조된 기생여귀 전초 500g을 5L의 50% 에탄올로 48시간 2회 냉침 추출하였다. 추출액을 필터(어드벡 No. 1)로 여과한 후에 여액을 40℃에서 감압 농축하여 에탄올 추출물을 수득하였다. 감압 농축한 추출물을 동결건조하여 분말 형태의 추출물을 수득하였다.

[0047] 2. 혈행 개선 효과 실험

[0048] 2.1 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1 유전자의 mRNA 발현 억제 효과 평가

[0049] 상기 추출물이 인간 혈관 내피세포(Human umbilical vascular vein endothelial cells)의 세포 부착분자인 ICAM-1 및 VCAM-1 유전자의 mRNA 발현에 미치는 효과를 아래와 같이 평가하였다.

[0050] 2% FBS(fetal bovine serum)와 함유된 EGM-2(Endothelial Growth Media-2, Lonza, Walkersville, MD, USA) 배지에 HUVEC 세포를 1×10^6 cells/이 되도록 하여 6 웰 플레이트에 접종하여 37℃, 5% CO₂ 습윤 조건 하에서 24 시간 동안 배양하였다. TNF- α (10 ng/ml) 처리 1시간 후 기생여귀 추출물 시료를 25, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 2번 세척하고 Trizol(Invitrogen)을 넣어서 세포를 용해시킨 후 chloroform을 넣고 13000rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 상층액과 isopropanol을 섞은 후 반응시켜 RNA를 침전시킨 후 에탄올로 1회 세척하여 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 이용하여 정량 후 역전사 연쇄증합반응 키트인 Superscript kit(Invitrogen)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 cDNA를 합성하였다. 증합효소 연쇄반응(PCR)은 합성된 cDNA로부터 VCAM-1, ICAM-1, GAPDH를 증폭시키기 위하여 1 μ l cDNA, 10 pM의 5'과 3' primer, AccuPower Pfu PCR Premix (Bioneer, KOREA)를 섞고 증류수로 전체를 20 μ l로 맞춘 다음, 95℃ 30초, 55℃ 30초, 72℃ 1분을 설정하여 30 cycle 반응시켰다. 사용된 프라이머 서열은 아래의 [표 1]과 같으며 1% agarose gel을 이용하여 전기영동하여 PCR 산물을 확인하였다.

표 1

[0051] 프라이머 세트

hVCAM-1(F)	5 '-AAGATGGTCGTGATCCTTGG-3'
hVCAM-1(R)	5 '-GGTGTGCAAGTCAATGAGA-3'
hICAM-1(F)	5 '-GGCTGGAGCTGTTTGAAC-3'

hICAM-1(R)	5 '-CTGACAAGTTGTGGGGGAGT-3'
hGAPDH(F)	5 '-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
hGAPDH(R)	5 '-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

[0052] 결과를 도 1에 나타내었다. 도 1의 결과는 기생여꾸 추출물이 농도 의존적으로 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1 유전자의 mRNA 발현을 억제함을 보여준다.

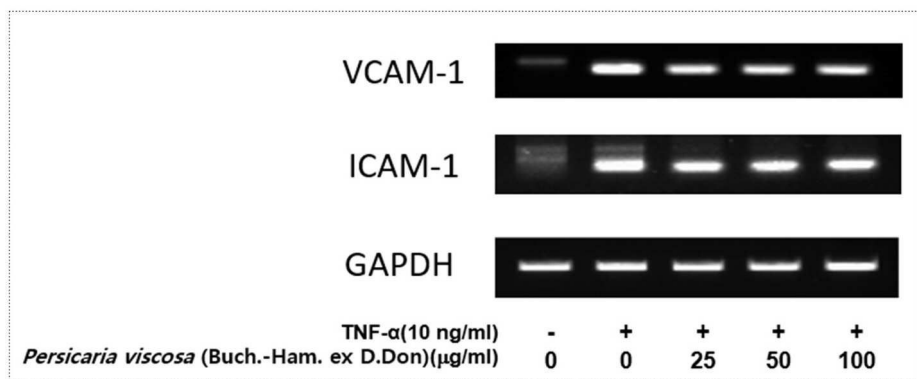
[0053] 2.2 인간 혈관 내피세포(HUVEC)에서 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1 단백질 발현 억제 효과 평가

[0054] 혈관내피세포를 100 mm dish에 3×10^6 cells/well 농도로 24시간 배양한 후 TNF- α (10 ng/ml) 처리 1시간 후 기생여꾸 추출물 시료를 25, 50 및 100 μ g/ml의 농도로 처리하여 24 시간 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척 후 세포를 얻어 원심 분리하여 pellet에 RIPA buffer를 첨가 후 4°C, 13000rpm에서 15분간 원심 분리하고 상등액을 옮긴 후 Bradford(Bio-Rad, USA)를 이용하여 단백질 정량하여 각각의 시료를 8% SDS polyacrylamide gel에 전기영동하고 Nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. NC membrane을 5% skim milk가 포함된 blocking buffer(0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 blocking한 후 1차 antibody(VCAM-1, ICAM-1, GAPDH)를 1:1000으로 희석하여 넣고 over night 반응하였다. 세척 후 2차 antibody(Anti-rabbit IgG)를 1:10000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응시키고 세척 후 ECL solution을 반응시켜 단백질 발현 정도를 Chemidoc image analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0055] 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2의 결과는 단백질 발현 수준에 있어서도, 기생여꾸 추출물이 농도 의존적으로 세포부착분자 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 억제함을 보여준다.

도면

도면1



도면2

